

101049579

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/049,579

#6

RECEIVED

JUL 23 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

TECH CENTER 1600/2900

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference WO 800155-Kp	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/NL 00/ 00559	International filing date (day/month/year) 09/08/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/08/1999
Applicant FACULTEIT GENEESKUNDE UNIVERSITEIT Utrecht		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

contained in the international application in written form.

filed together with the international application in computer readable form.

furnished subsequently to this Authority in written form.

furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

ANTIVIRAL PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING IRON CHELATORS

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

as suggested by the applicant.

because the applicant failed to suggest a figure.

because this figure better characterizes the invention.

6

None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL 00/00559

Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of item 5 of the first sheet)

The invention discloses pharmaceutical compositions for the treatment of viral infections, in particular the human immunodeficiency virus (HIV). The compositions comprises a iron chelator and an antiviral agent.

Suitable iron chelators are selected from the group of hydroxymates (such as deferoxamine), from hydroxypyridones (such as deferipone) or from nucleic acid binding chemotherapeutics (such as bleomycin). Suitable antiviral agents are protease inhibitors, preferably ritonavir, or reverse transcriptase inhibitors, preferably dideoxyinosine.

RECEIVED

JUL 23 2002

TECH CENTER 1600/2900

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 00/00559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K45/06 A61K31/16 A61K38/18 A61P39/04 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, PAJ, WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MALLEY S D ET AL: "SYNERGISTIC ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 EFFECT OF HYDROXYAMATE COMPOUNDS WITH 2',3'-DIDEOXYINOSINE IN INFECTED RESTING HUMAN LYMPHOCYTES"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,</p> <p>vol. 91, 1 November 1994 (1994-11-01),</p> <p>pages 11017-11021, XP000572692</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>abstract; figures 1-3</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,2,5,6

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 2002

Date of mailing of the international search report

20/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Laffargue-Haak, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 00/00559

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO W-Y ET AL: "ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ACTIVITY OF HYDROXYUREA INCOMBINATION WITH 2',3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES" MOLECULAR PHARMACOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 46, no. 4, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 767-772, XP000573476 ISSN: 0026-895X page 769, column 2, paragraph 2 - last paragraph; figure 3; table 5 ---	1,2,5,6
X	WO 92 15329 A (US GOVERNMENT) 17 September 1992 (1992-09-17) page 5, line 5; claims 1,9 page 5, line 8 page 5, line 21 - line 30 claims 7,18 ---	1,2,5,6
A	WO 92 16200 A (US ARMY) 1 October 1992 (1992-10-01) ---	
P,X	GEORGIOU NIKI A ET AL: "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human mononuclear blood cells by the iron chelators deferoxamine, deferiprone, and bleomycin." JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 181, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 484-490, XP001027530 ISSN: 0022-1899 abstract; figure 5 page 487, column 1, last paragraph -column 2, paragraph 1 -----	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 00/00559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9215329	A 17-09-1992	AU 1463992 A WO 9215329 A1		06-10-1992 17-09-1992
WO 9216200	A 01-10-1992	AU 1672692 A WO 9216200 A1		21-10-1992 01-10-1992

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/049579

Applicant's or agent's file reference WO 800155	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/NL 00/ 00559	International filing date (day/month/year) 09/08/2000	Priority date (day/month/year) 13/08/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K45/06		
Applicant FACULTEIT GENEESKUNDE UNIVERSITEIT UTRECHT et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I Basis of the report

II Priority

III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV Lack of unity of invention

V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI Certain documents cited

VII Certain defects in the international application

VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27/02/2001	Date of completion of this report 14/06/2002
Name and mailing address of the IPEA/ European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer GELLIE B R Tel. (+49-89) 2399 2828



I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receiving Office use only

International Application No.

PCT/NL

00100559

International Filing Date

09 AUG 2000

(09.08.00)

BUREAU VOOR DE INDUSTRIELE EIGENDOM
P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) WO 800155-Kp

Box No. I TITLE OF INVENTION

Pharmaceutical composition for the treatment of viral infections, in particular of the Human Immunodeficiency Virus (HIV).

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Faculteit Geneeskunde

Universiteit Utrecht

Universiteitsweg 100

P.O. Box 80030

NL-3508 TA UTRECHT

the Netherlands

This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

NL

State (that is, country) of residence:

NL

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

VAN ASBECK, Bernt Sweder

Verheullaan 19

NL-3971 RD DRIEBERGEN

the Netherlands

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

NL

State (that is, country) of residence:

NL

This person is applicant all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Telephone No.

+31-20-6236832

KUPECZ, Arpad et al.

Octrooibureau Los en Stigter B.V.

Weteringschans 96

NL-1017 XS AMSTERDAM

the Netherlands

Facsimile No.

+31-20-6260007

Teleprinter No.

16461 L S NL

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MARX, Johannes Josephus Maria
Johan Buziaulaan 41
NL-3584 ZT UTRECHT
The Netherlands

This person is:

 applicant only

P

 applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)State (that is, country) of nationality:
NLState (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

AP ARIPO Patent: **GH** Ghana, **GM** Gambia, **KE** Kenya, **LS** Lesotho, **MW** Malawi, **SD** Sudan, **SL** Sierra Leone, **SZ** Swaziland, **TZ** United Republic of Tanzania, **UG** Uganda, **ZW** Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA Eurasian Patent: **AM** Armenia, **AZ** Azerbaijan, **BY** Belarus, **KG** Kyrgyzstan, **KZ** Kazakhstan, **MD** Republic of Moldova, **RU** Russian Federation, **TJ** Tajikistan, **TM** Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: **AT** Austria, **BE** Belgium, **CH** and **LI** Switzerland and Liechtenstein, **CY** Cyprus, **DE** Germany, **DK** Denmark, **ES** Spain, **FI** Finland, **FR** France, **GB** United Kingdom, **GR** Greece, **IE** Ireland, **IT** Italy, **LU** Luxembourg, **MC** Monaco, **NL** Netherlands, **PT** Portugal, **SE** Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: **BF** Burkina Faso, **BJ** Benin, **CF** Central African Republic, **CG** Congo, **CI** Côte d'Ivoire, **CM** Cameroon, **GA** Gabon, **GN** Guinea, **GW** Guinea-Bissau, **ML** Mali, **MR** Mauritania, **NE** Niger, **SN** Senegal, **TD** Chad, **TG** Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

<input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago
<input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia	<input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America
<input checked="" type="checkbox"/> IN India	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan
<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya	<input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe
<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan	
<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

.....

.....

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

 Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) <i>(13/08/2000)</i> <i>13 AUG 1999</i>	1012825	NL		
item (2)				
item (3)				

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / NL

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)
07/06/2000 NL

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : *24*

description (excluding sequence listing part) : 10

claims : 1

abstract : 1

drawings : 6

sequence listing part of description :

Total number of sheets : 21

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- fee calculation sheet
- separate signed power of attorney
- copy of general power of attorney; reference number, if any:
- statement explaining lack of signature
- priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- translation of international application into (language):
- separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- other (specify): **copy of Search Report**

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 6

Language of filing of the international application: NL

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Amsterdam, 08/08/2000



KUPECZ, Arpad

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:

09 AUG 2000

09.08.00

2. Drawings:

received:

3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):

5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /

6. Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

not received:

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

31 AUGUST 2000

(31.08.00)

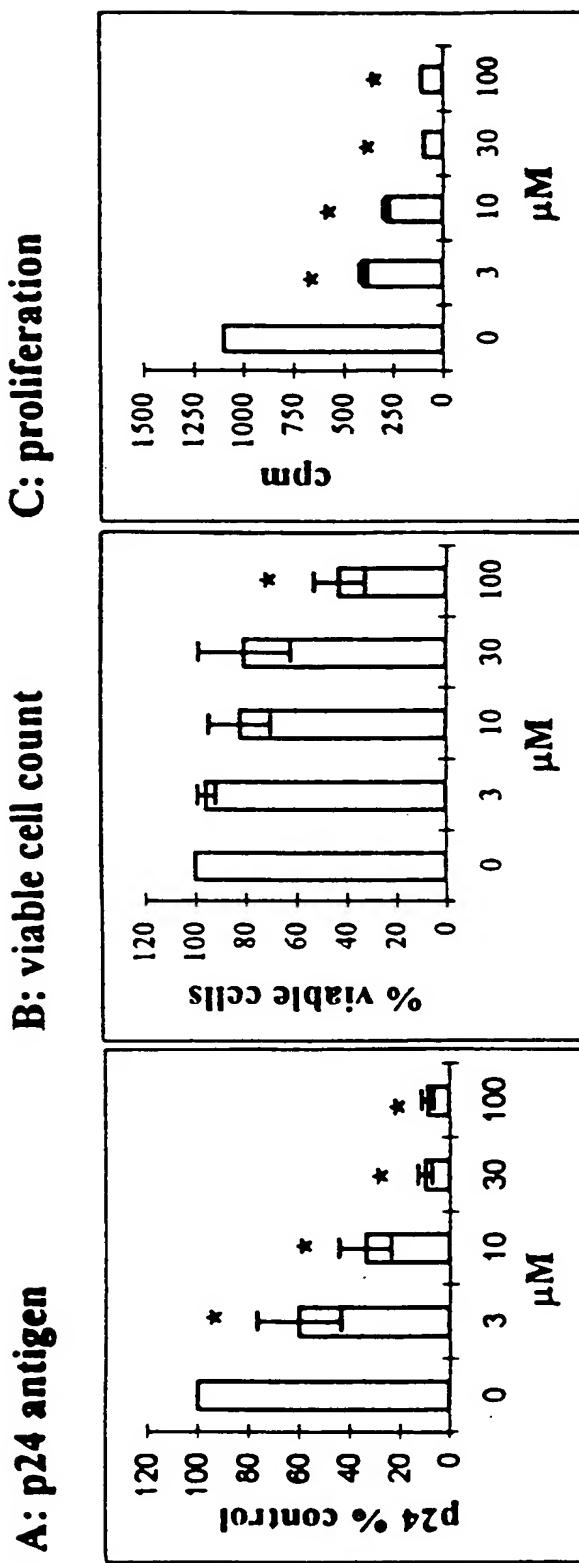


FIG. 1

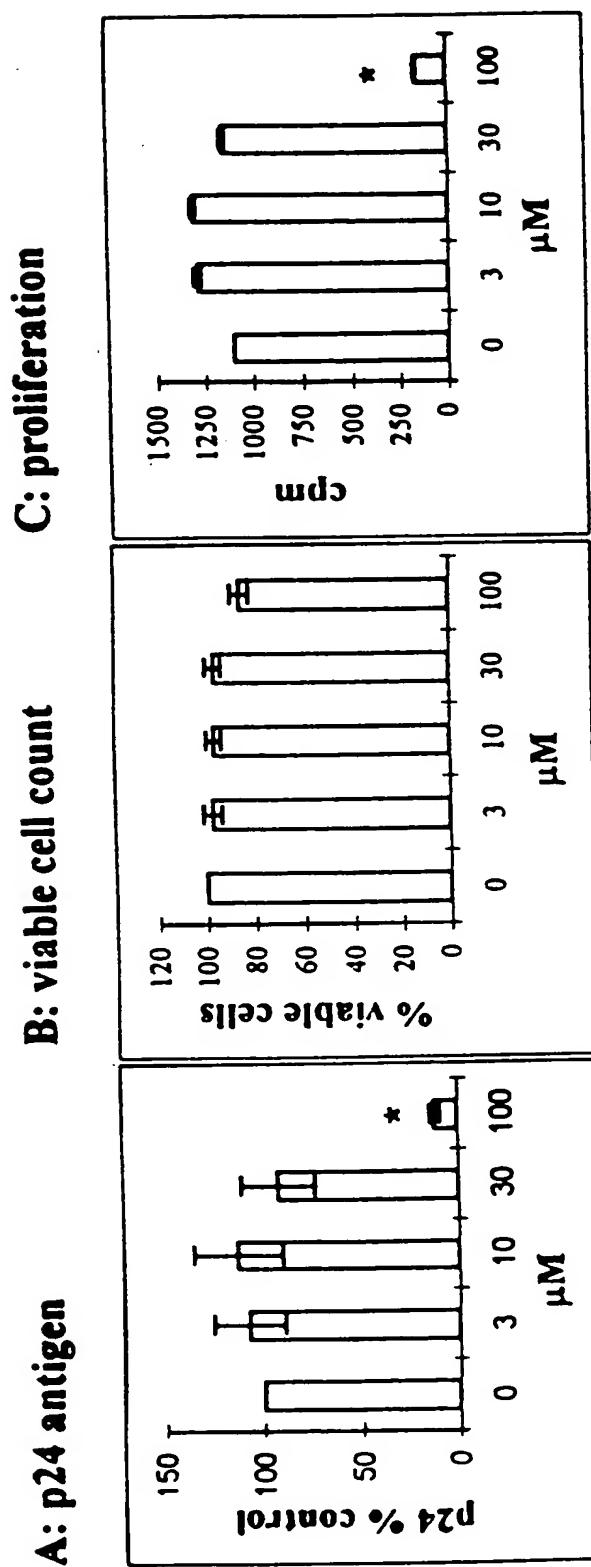


FIG. 2

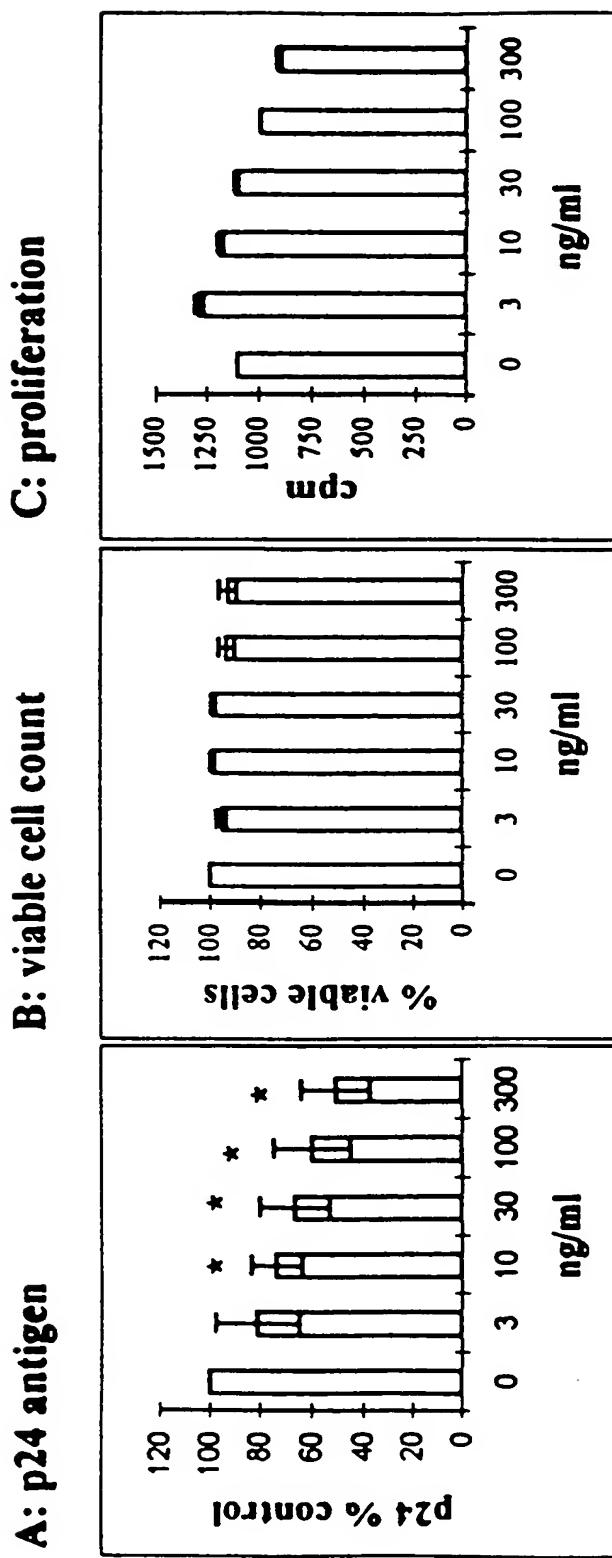
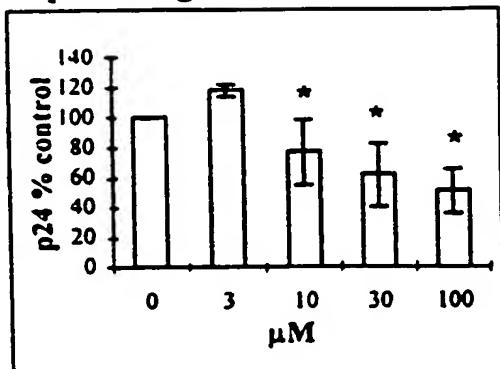
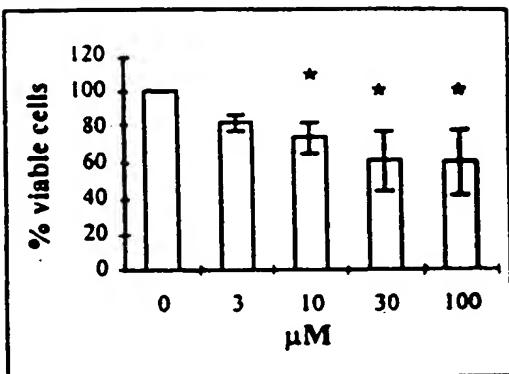
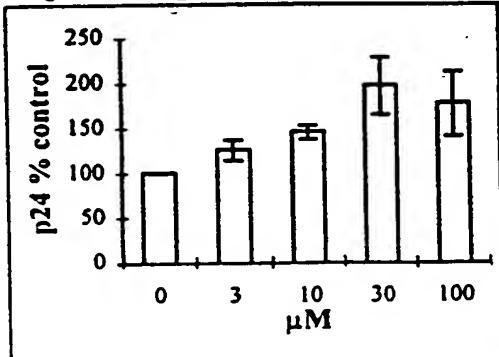
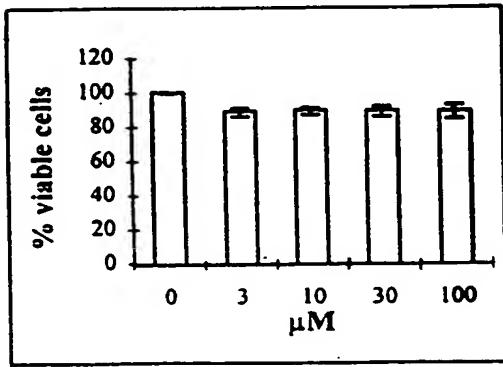
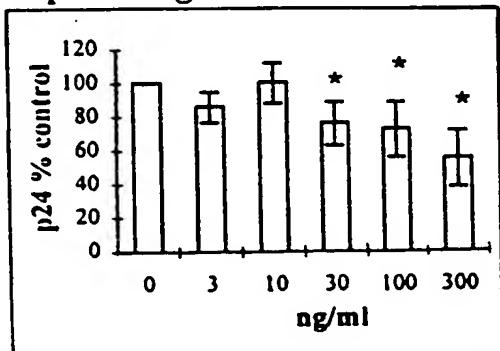
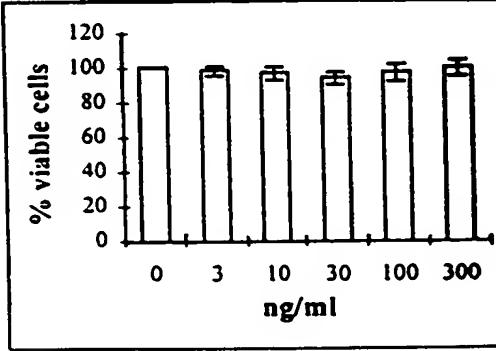
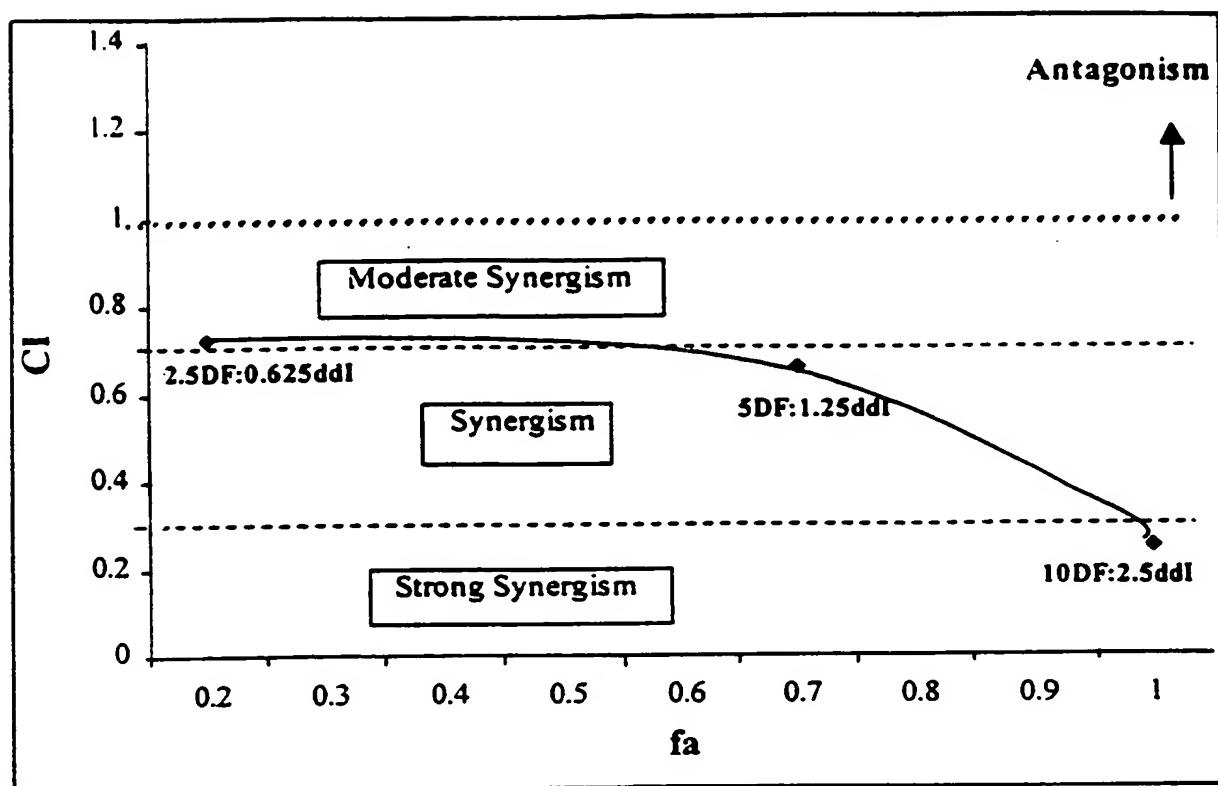


FIG. 3

A: Dextroamphetamine (DF)**I: p24 antigen****II: viable cell count****B: Deferiprone (L1)****I: p24 antigen****II: viable cell count****C: Bleomycin (BLM)****I: p24 antigen****II: viable cell count****FIG. 4**



-FIG. 5

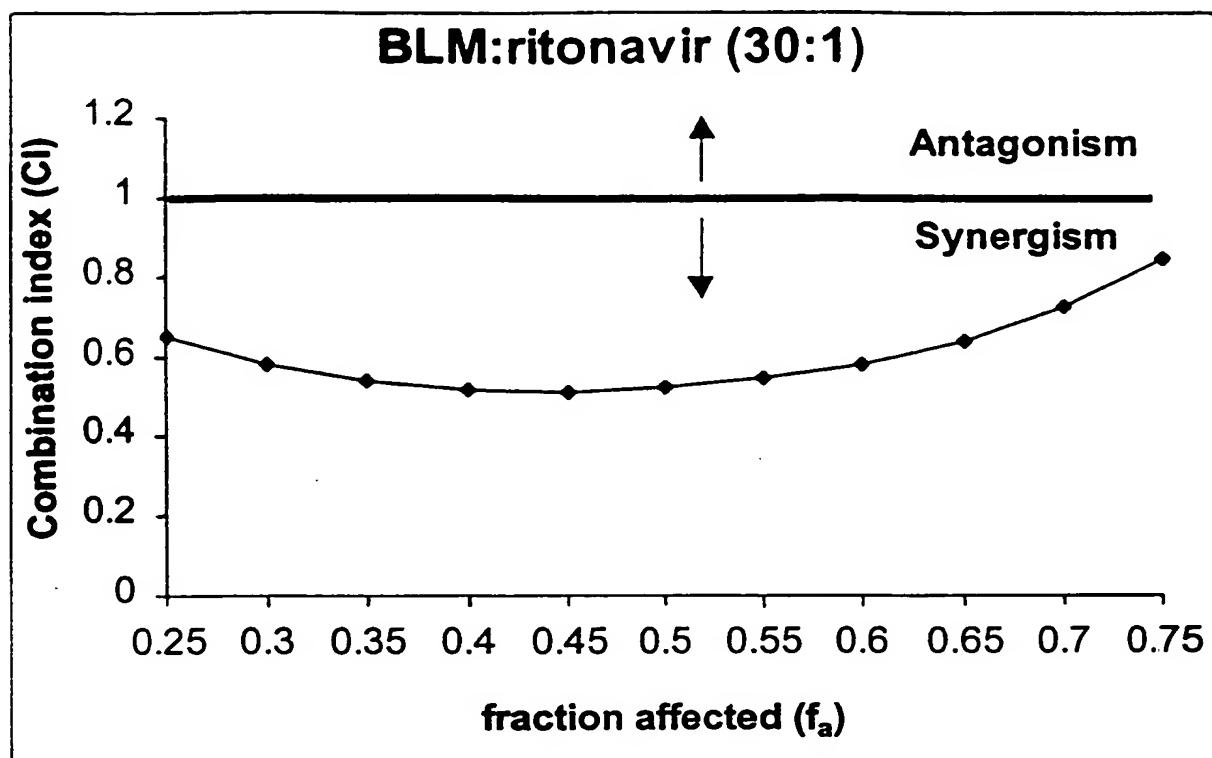


FIG. 6

WO 800115-Kp

Farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV).

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV).

5 Virale infecties in het bijzonder infecties door het humane immunodeficiency virus (HIV) vormen een ernstige bedreiging voor de volksgezondheid. Wereldwijd worden veel inspanningen gedaan om te komen tot een farmaceuticum voor de bestrijding van deze veelal ongeneeslijke ziekte.

10 Het is bekend, dat ijzer betrokken is bij de replicatie van de humane immunodeficiency virus. In de eerste plaats, het HIV-1 long terminal repeat (LTR) gedeelte bevat nucleaire factor (NF)-kB respons elementen, die provirale transcriptie reguleren. NF-kB activering kan worden beïnvloed met ijzer via de productie van reactieve zuurstof 15 species.

Een tweede route waarlangs ijzerchelatie HIV replicatie kan beïnvloeden is de remming van de DNA synthese door inactivering van ijzer-afhankelijke rebonucleotide reductase.

20 Een andere strategie, die kan worden toegepast bij targeting van ijzerchelatoren tegen HIV-1 is een directe virale DNA/RNA aanval.

25 De onderhavige uitvinding beoogt thans een farmaceuticum te verschaffen voor een efficiënte behandeling van virale infectie in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus, waartoe het farmaceuticum het kenmerk heeft, dat het farmaceuticum een preparaat omvat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator bevat.

30 Geschikte ijzerchelatoren volgens de uitvinding kunnen zijn gekozen uit de groep van de hydroxamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridinonen (zoals deferipon), en de nucleïnezuur-bindende chemotherapeutica (zoals bleomycine).

35 Bijzonder verrassend is gebleken dat wanneer men in vitro naast het preparaat met als actief bestanddeel een

ijzerchelator, tevens een preparaat dat een andere virusremmende verbinding bevat gebruikt bijzonder gunstige resultaten worden verkregen tengevolge van het optreden van een synergistisch effect. Hierbij bleek een proteaseremmer, in 5 het bijzonder ritonavir, bijzonder geschikt te zijn als virusremmend middel.

Een ander virusremmend middel dat met ijzerchelatoren een gunstige synergi oplevert is reverse transcriptaseremmer, in het bijzonder dideoxyinosine.

10 Aanvraagster heeft in dit verband de invloed onderzocht van deferoxiamine (DF), deferipron (L1) en bleomycine (BLM) op de HIV-1 replicatie in primaire bloedcellen. Daarbij werd gebruik gemaakt van humane perifere bloedlymfocyten (PBL) en monocyten-afgeleide macrofagen (MDM) zijnde de belangrijkste targetcellen voor HIV. Gebleken is hierbij dat de aanzienlijke afname van HIV-1 replicatie door DF gepaard ging met proliferatie-inhibitie. Soortgelijks werd waargenomen met L1. Verrassend was dat BLM de virale replicatie in PBL en MDM remde zonder invloed te hebben op de lympho-20 tenproliferatie. De toepassing van de combinatie van ijzerchelatoren met de op zichzelf bekende antivirale middelen voor antivirale combinatietherapie werd onderzocht. Wanneer DF werd toegepast in combinatie met de nucleoside analoog dideoxyinosine (ddI) bleek een verrassende synergistische 25 inhibitie van p24 in HIV-geïnfecteerde PBL op te treden.

De bij de studie gebruikte materialen en toegepaste methoden zijn als volgt.

Cel isolatie.

30 Perifere bloedmononucleaire cel (PBMC) fracties werden geïsoleerd uit gehepariniseerd bloed van HIV-1-, HIV-2- en hepatitis B-seronegatieve donoren (Bloedbank, Utrecht) via Ficoll-Isopaque gradiënt separatie. De cellen werden twee keer gewassen en vervolgens hetzij onderworpen aan een 35 tegenstroom centrifugale elutriatie onder oplevering van monocyte fracties, hetzij liet men monocyten in de PBMC fractie hechten aan met fibronectine bekledde kolven voorafgaande aan het oogsten van de PBL fractie. De monocyten hadden een zuiverheid van >95% volgens de criteria van

celmorphologie op May-Grünwald-Giemsa-gekleurde cytosmears en via niet-specifieke esterase kleuring onder gebruikmaking van α -naftylacetaat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en PBL >85% zuiverheid via May-Grünwald-Giemsa-kleuring. Het 5 percentage levende cellen van beide celtypes was >95% bij het begin van het experiment, zoals bepaald volgens de trypan-blauw exclusie. Geïsoleerde monocyten werden gekweekt in een suspensie bij een concentratie van 2×10^6 cellen/ml in teflon kolfven teneinde hechting tot het minimum te beperken (Nalgene, Rochester, NY), waarbij men de monocyten liet 10 differentiëren gedurende 7 dagen. Het MDM medium bestond uit Dulbecco's gemodificeerd Eagle's medium aangevuld met 10% hitte-geïnactiveerde menselijk AB serum, negatief voor anti-HIV antilichamen (Bloedbank, Utrecht), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycine 15 (Life Technologies Ltd., Paisley, Schotland), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ciprofloxacine (Bayer, Leverkusen, Duitsland), 0,6 mg/ml L-glutamine (Sigma) en 3,4 g/L bicarbonaat (Merck, Darmstadt, Duitsland). Geïsoleerd PBL werd gedurende 3 dagen gestimuleerd te profileren onder toevoeging van 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinine (PHA; Sigma) in RPMI-1640 (Life Technologies Ltd.) medium aangevuld met 10% hitte geïnactiveerde foetaal 20 kalf serum (Life Technologies Ltd.) en 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycine. Na PHA stimulatie werd het PBL gekweekt in een medium met daarin 10 U/ml humane recombinant IL-2 (Boehringer, 25 Mannheim, Duitsland). Alle incubaties werden uitgevoerd in 96-druppelplaatjes met vlakke bodem bij 37°C, 5% CO_2 en 95% lucht.

HIV infectie en p24 metingen.

30 De cellen werden gedurende 2 uur geïnfecteerd met HIV-1_{Ba-1}. Macrofagen werden geïnfecteerd met multipliciteit (MOI) van 0,005 en lymfocyten met een MOI van 0,001. De cellen werden vervolgens twee keer gewassen ter verwijdering van de overmaat virus en vervolgens geïncubeerd met hetzelf 35 DF (Novartis Pharma, Arnhem), LI (afkomstig van Duchefa Farma B.V., Haarlem) hetzelf BLM (H. Lundbeck A/S. Kopenhagen, Denemarken) gedurende 5 dagen. Virus in het kweeksupernatant werd geïnactiveerd in een eindconcentratie van 0,05% empigen (Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla,

CA). De aanwezigheid van HIV-1 in het geinactiveerde supernatant werd gevolgd door controle van het p24 antigeen via de enzyme-gekoppelde immunoabsorbent test (ELISA).

Lymfocyte proliferatie metingen.

5 Aangezien ijzerchelatoren cellulaire proliferatie kunnen beïnvloeden werd het effect van de drie ijzerchelatoren op PBL proliferatie onderzocht. Dit werd uitgevoerd door gedurende de nacht de ^3H -thymidine (^3H -TdR) inbouw in DNA te volgen. Er werd 25 μl ^3H -TdR (0,5 μCi , Amersham International plc, Engeland) toegevoegd in aanwezigheid van DF, L1, BLM of DF/ddI combinatie, in een totaal volume van 200 μl celsuspensie na 4 dagen incubatie met de verschillende concentraties van de toegepaste verbinding. Celincubaties werden in 96-putjes bevattende kunststof platen (Costrar, Cambridge, MA, Amerika). Na incubatie gedurende de nacht met ^3H -TdR werden de cellen geoogst onder gebruikmaking van een automatische microcelverzamelaar (Titertek® celverzakelaar 530). Het filter werd vervolgens gedroogd en ondergedompeld in een scintillatie cocktail (Wallace UK). De radioactiviteit werd geteld in een Mark II vloeibaar scintillatiesysteem (Model x, trictron analytics, Inc.).

Cytotoxiciteit.

25 Mogelijke cytotoxiciteit van DF, L1 of BLM werd onderzocht door de MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromide] (Sigma) test.

Studies van DF-ddI combinatie.

30 Drie afzonderlijke experimenten werden uitgevoerd in hoofdzaak zoals uiteengezet onder hoofdstuk HIV infectie en p24 metingen. Meervoudig verdunde gefixeerde verhoudingscombinaties van de geneesmiddelen, of enkelvoudige geneesmiddelen werden toegevoegd bij elk incubatiepunt. De IC_{50} (remmende concentratie) voor elk geneesmiddel werd berekend 35 onder gebruikmaking van het computer software programma CalcuSyn. Het gecombineerde geneesmiddel effect werd geëvalueerd door middel van het gemiddelde effect principe en de isobogram methode. Deze methode omvat het uitzetten van het dosis-effect curve voor elk geneesmiddel alleen dan wel

in combinatie van elkaar. De helling van de gemiddelde-effect curve en de x intercept van de curve werden vervolgens toegepast voor de computerberekening van een combinatie-index (CI). De CI waarden werden gebaseerd op de 5 klassieke isobogram vergelijking en CI waarden van <1, 1 en >1 wijzen op synergisme (groter dan het verwachte additieve effect), additieve effecten en antagonisme (minder dan het verwachte additieve effect). De aangetaste fractie (f_a) werd berekend voor elke geneesmiddelcombinatie en voor elk 10 geneesmiddel alleen na p24 metingen in geïnfecteerd PBL geïncubeerd gedurende 5 dagen met de onderzochte verbindingen (zie HIV infectie en p24 metingen).

Statistische analyse.

15 Herhaalde metingen ANOVA en student Newman-Keuls test werden toegepast voor het analyseren van de gegevens. P waarden beneden 0,05 werden als significant beschouwd.

Resultaten

20 *Effect van DF op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBI.*

DF bleek p24 concentraties in kweek supernatanten te verlagen. Bij een concentratie van 3 μ M DF werd een 40% afname van virus replicatie in PBL (19 versus 11 ng p24/ml, 25 n=3, p<0,05) waargenomen. Een concentratie aan de verbinding van 30 μ M bleek de p24 niveaus te verminderen met >90% (fig. 1A) van 19 tot 1,9 ng p24/ml (n=3). Teneinde de mogelijkheid uit te sluiten dat deze remmende invloed te danken zou zijn aan cytotoxiciteit werd het percentage levende cellen gemonitord. Een DF concentratie van 100 μ M bleek cytotoxisch te zijn (fig. 1B). Bovendien werd tengevolge van de anti-proliferatieve eigenschappen van DF ook de cellulaire proliferatie gemonitord. De waargenomen afname in p24 ging gepaard met een afname in proliferatie (fig. 1C). Gebleken is dat 35 non-cytotoxische DF concentraties geschikt waren voor het doen afnemen van de HIV replicatie, welke afname gepaard ging met cellulaire proliferatie-remming.

Effect van L1 op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBL>

HIV-1 replicatie in lymfocyten nam af tot minimale concentraties door $100 \mu\text{M}$ L1 (fig. 2A). Deze concentratie 5 was niet cytotoxisch in PBL (fig. 2B). Er blijkt een drempelwaarde te zijn in L1 concentratie, waarbij de remmingscurve zeer steil was, welk verschijnsel eveneens gepaard ging met een afname in proliferatie (fig. 2C). Zo kon de waargenomen HIV-inhibitie met L1 worden toegeschreven aan 10 de cellulaire proliferatie inhibitie. Bij lagere concentraties aan de onderzochte verbinding kon een geringe toename in p24 antigeen productie worden waargenomen (fig. 2A).

Effect van BLM op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBL.

BLM bleek dosisafhankelijk HIV-1 replicatie te verminderen in lymfocyten (fig. 3A). Deze verbinding bleek niet cytotoxisch te zijn in PBL (fig. 3B). Bij concentraties in het traject van 3-300 ng BLM/ml bleek een 20-50% verlaging 20 teweeg te worden gebracht, hetgeen overeenkwam met een afname van 19 tot 15 (20%) of 9,5 (50%) ng p24/ml (n=3) (fig. 3A). Cellulaire proliferatie bleef in tact (fig. 3C). Hieruit blijkt dat de HIV-1 inhibitie door BLM, in tegenstelling tot DF en L1, via een ander mechanisme verliep dan 25 de cellulaire proliferatie inhibitie.

Invloed van DF, L1, en BLM op HIV-1 replicatie en cytotoxiciteit in MDM.

In MDM, DF concentraties rond de $100 \mu\text{M}$ bleek de le- 30 vende replicatie te verminderen met maximaal 50% (1,2 versus 0,6 ng p24/ml) in een dosis afhankelijke manier (fig. 4AI). Deze p24 afname bleek echter gepaard te gaan met de aantasting van de cytotoxiciteit (fig. 4AII). L1 in de bestudeerde concentraties bleek de p24 antigeen productie verrassender- 35 wijs tweevoudig te doen toenemen bij $30 \mu\text{M}$ (fig. 4BI). Deze concentraties bleken niet cytotoxisch te zijn (fig. 4BII).

In MDM werd voorts eveneens een dosis afhankelijke afname in p24 concentraties waargenomen met een 50% vermindering bij 300 ng BLM/ml van 1,2 tot 0,6 ng p24/ml (fig.

4CI). Gebleken is dat BLM concentraties, soortgelijke concentraties als PBL, het percentage levende cellen in MDM (fig. 4CII) niet hebben aangetast.

5 *Gecombineerde antivirale invloed van DF-ddI.*

Een matig tot sterk synergisme werd waargenomen bij gebruik van DF in combinatie met ddI. Fig. 5 toont een representatieve grafiek voor de combinatie index (CI) met betrekking tot een fractie die is aangetast (f_a) voor de inhibitie van HIV door een mengsel van DF en ddI (molair verhouding 4:1). IC_{50} van DF was 8,5 μM en dat van ddI 3,7 μM . Uit fig. 5 blijkt duidelijk dat er een aanzienlijk synergisme is bij alle f_a , die zijn verkregen met verschillende combinaties, waarbij het synergisme sterker is naarmate f_a toeneemt. Rondom de IC_{50} concentraties van beide DF en ddI (combinatiepunten op fig. 5: 10 μM DF: 2,5 μM ddI), werd de hoogste f_a waarde verkregen en de combinatie was sterk synergistisch. Cellulaire proliferatie werd gemonitord met deze combinaties met elk geneesmiddel afzonderlijk. Gebleken is dat ddI in combinatie met DF niet een additieve remmende invloed had op cellulaire proliferatie vergeleken met DF alleen.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van figuren 1-6.

- Fig. 1. Effect van DF op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met DF.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1_{Ba-L} bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende DF concentraties. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na DF incubaties, vergeleken met p24 gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van DF (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubatie met DF, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van DF (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door over-

nacht ^3H -thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met DF; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na DF incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van DF. Resultaten 5 zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test, $*p<0,05$). 100% p24 productie komt overeen met 19 ng p24/ml.

- Fig. 2. Effect van L1 op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met L1.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1_{Ba-L} bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd 15 met verschillende L1 concentraties. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na L1 incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1 (gesteld op 100% p24). 20 Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen L1 incubatie met L1, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1 (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door 25 overnacht ^3H -thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met L1; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na L1 incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1. Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test, $*p<0,05$). 100% p24 productie komt overeen 30 met 19 ng p24/ml.

- Fig. 3. Effect van BLM op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met BLM.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1_{Ba-L} bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende BLM concentraties. Na 5 dagen werd het su-

pernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na BLM incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van BLM (gesteld op 100% p24).

5 Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubaties met BLM, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van BLM (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door 10 overnacht ^3H - thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met BLM; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na BLM incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van BLM. Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo 15 (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test, *p<0,05). 100% p24 productie komt overeen met 19 ng p24/ml.

- Fig. 4. Effect van DF (AI-II), L1 (BI-II) en BLM (CI-II) op HIV-1 replicatie (A-CI) en cytotoxiciteit (A-CII) in 20 MDM na 5 dagen incubatie.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1_{Ba-L} bij MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende concentraties agens. Na 5 dagen werd het 25 supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van de verbindingen (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt 30 weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubatie, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van de verbindingen (gesteld op 100% levende cellen). Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met 35 behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test, *p<0,05). 100% p24 productie komt overeen met 1,2 ng p24/ml.

- Fig. 5. Grafische presentatie van de combinatie index (CI) gebaseerd op de fractie remming (fa = fraction affected) van het p24-antigeen door een mix van DF en ddI

(molaire ratio 4:1). Data punten op de grafiek wordt aangegeven als conc DF en ddI beide in μM . $\text{CI} < 1$, = 1 en > 1 duiden respectievelijk op synergistische, additieve en antagonistische effecten. De onderverdelingen in het synergistisch gebied ($\text{CI} > 0,7$, 0,3-0,7 en $< 0,3$ duiden respectievelijk op matig synergisme, synergisme en sterk synergisme) is volgens Chou en Talalay. De parameters worden verkregen met de gemiddelde effectberekening van Chou en Talalay en het CalcuSync computer software programma zoals beschreven bij "materialen en methoden". De IC_{50} van DF was $8,5 \mu\text{M}$ en die van ddI was $3,7 \mu\text{M}$ in dit experiment. Deze grafiek is representatief voor 3 onafhankelijke experimenten.

- Fig. 6. Grafische presentatie van de combinatie index (CI) gebaseerd op de fractie remming (fa = fraction affected) van het p24-antigeen door een mix van bleomycine (BLM) en ritonavir (ratio 30:1). Perifere bloed lymfocyten (PBL) werden 2 uur geïnfecteerd met $\text{HIV-1}_{\text{Ba-L}}$ bij een MOI van 0,001. De cellen werden vervolgens 2 keer gewassen om overmaat virus te verwijderen en daarna 5 dagen geïncubeerd met alleen BLM, alleen ritonavir of verschillende combinaties van beide stoffen. Virus in het supernatant van de celkweken werd geïnactiveerd in een eindconcentratie van 0,05% empigen en de aanwezigheid van HIV-1 in het geïnactiveerde supernatant werd gemeten door bepaling van het p24 antigeen met enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). $\text{CI} < 1$, = 1 en > 1 duiden respectievelijk op synergistische, additieve en antagonistische effecten, volgens Chou en Talalay. De parameters worden verkregen met de gemiddelde effectberekening (median effect equation) van Chou en Talalay en het CalcuSync computer software programma. De IC_{50} van BLM was $1,9 \mu\text{g/ml}$ en die van ritonavir was $0,04 \mu\text{M}$ in dit experiment. Deze grafiek is representatief voor twee onafhankelijke experimenten.

NIEUWE CONCLUSIES

1. Farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV), **met het kenmerk**, dat het farmaceuticum een preparaat omvat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator bevat en een preparaat dat een ander virusremmend middel bevat.
5 2. Farmaceuticum volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat de ijzerchelator gekozen is uit de groep van de hydroxamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridionen (zoals deferipron), en de nucleïnezuur-bindende chemotherapeutica (zoals bleomycine).
10 3. Farmaceuticum volgens onclusie 2, **met het kenmerk**, dat het virusremmende middel een proteaseremmer is.
15 4. Farmaceuticum volgens conclusie 3, **met het kenmerk**, dat de proteaseremmer ritonavir is.
 5. Farmaceuticum volgens conclusie 1, **met het kenmerk**, dat het virusremmende middel een reverse transcriptase-remmer is.
 6. Farmaceuticum volgens conclusie 5, **met het kenmerk**, dat de reverse transcriptaseremmer een dideoxyinosine is.

UITTREKSEL

De uitvinding beschrijft een farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV). Volgens de uitvinding omvat het farmaceuticum een preparaat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator bevat.

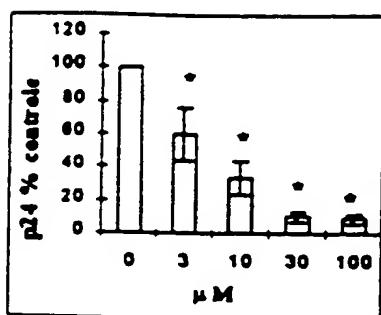
Geschikte ijzerchelatoren zijn gekozen uit de groep van de hydroxyamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridionen (zoals deferipon), en de nucleinezuur-binnde chemotherapeutica (zoals bleomycine).

10 Een synergistisch effect wordt verkregen in vitro wanneer naast het preparaat dat de ijzerchelator bevat tevens een preparaat wordt gebruikt, dat een ander virusremmend middel bevat.

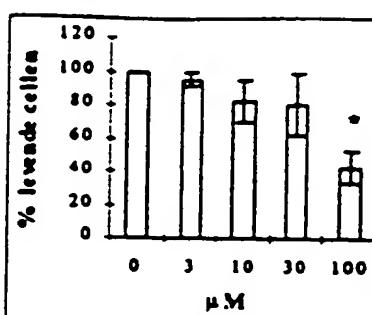
Als virusremmende verbinding komt een proteaseremmer, 15 bij voorkeur ritonavir, in aanmerking.

Een ander geschikt virusremmend middel is een reverse transcripteaseremmer, bij voorkeur een dideoxy-inosine.

A: p24 antigen



B: aantal levende cellen



C: proliferatie

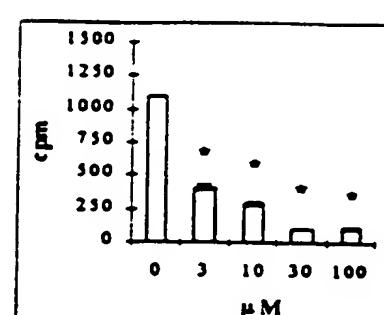


FIG. 1

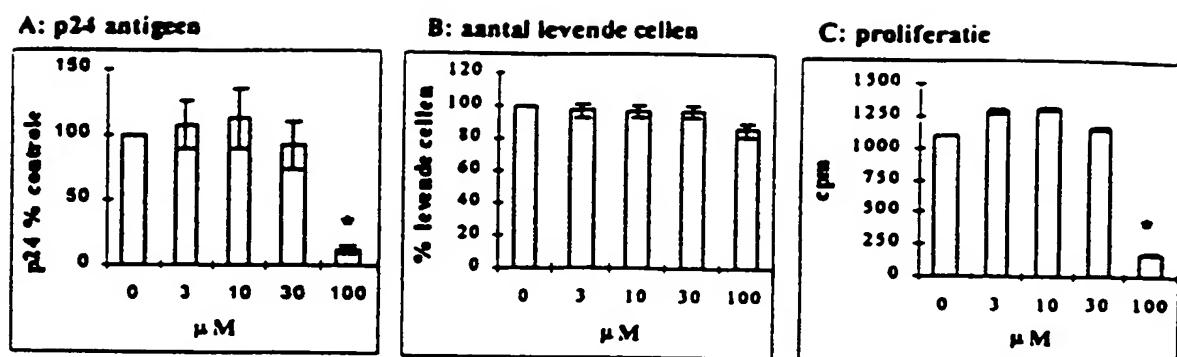
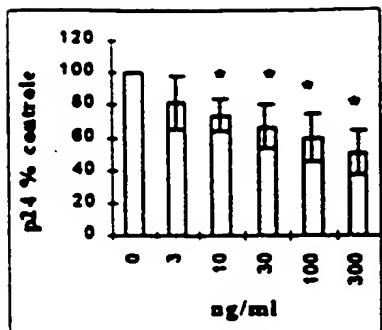
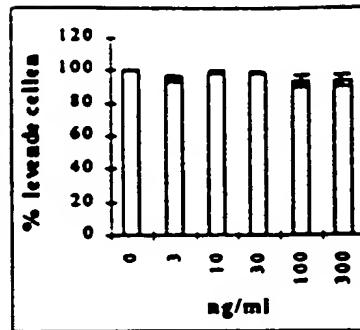


FIG. 2

A: p24 antigen



B: aantal levende cellen



C: proliferatie

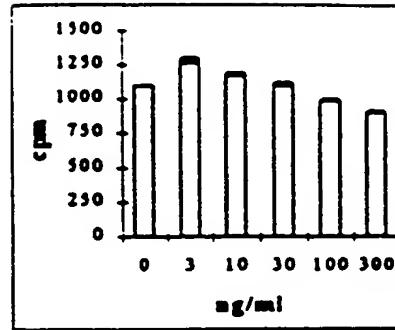
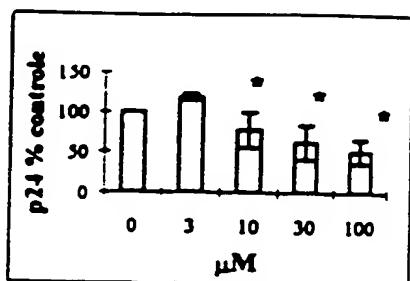
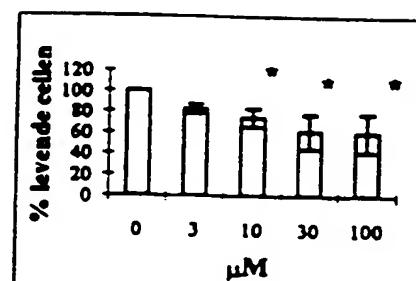
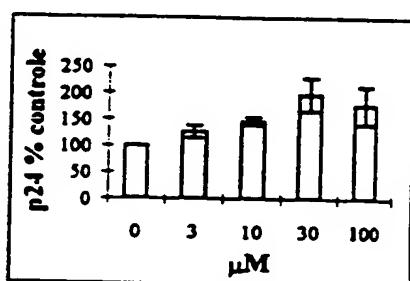
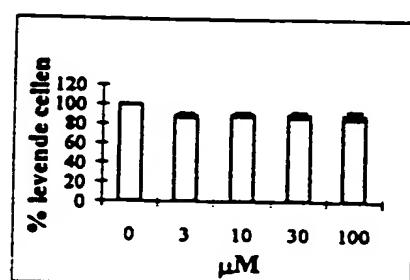
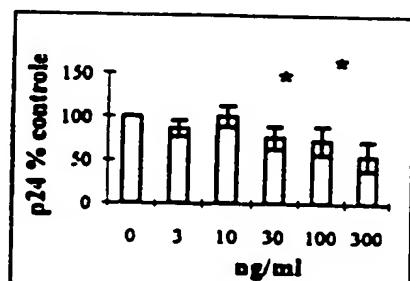
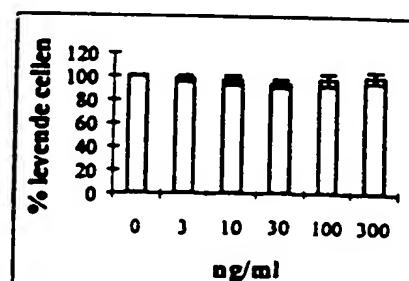


FIG. 3

A: Dextroamphetamine (DF)**I: p24 antigen****II: aantal levende cellen****B: Deseriprone (L1)****I: p24 antigen****II: aantal levende cellen****C: Bleomycine (BLM)****I: p24 antigen****II: aantal levende cellen****FIG. 4**

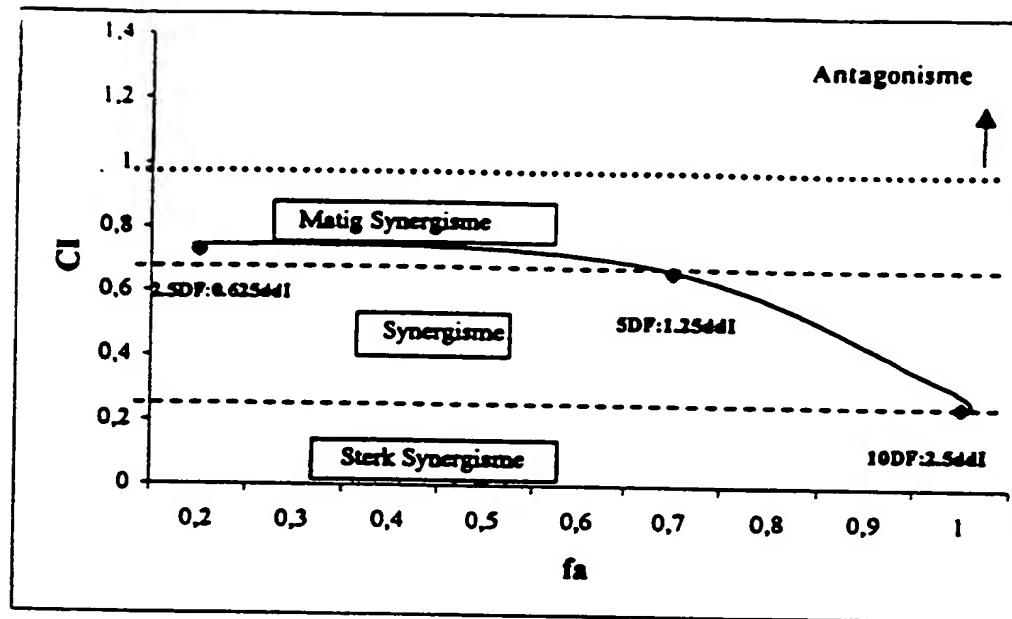


FIG. 5

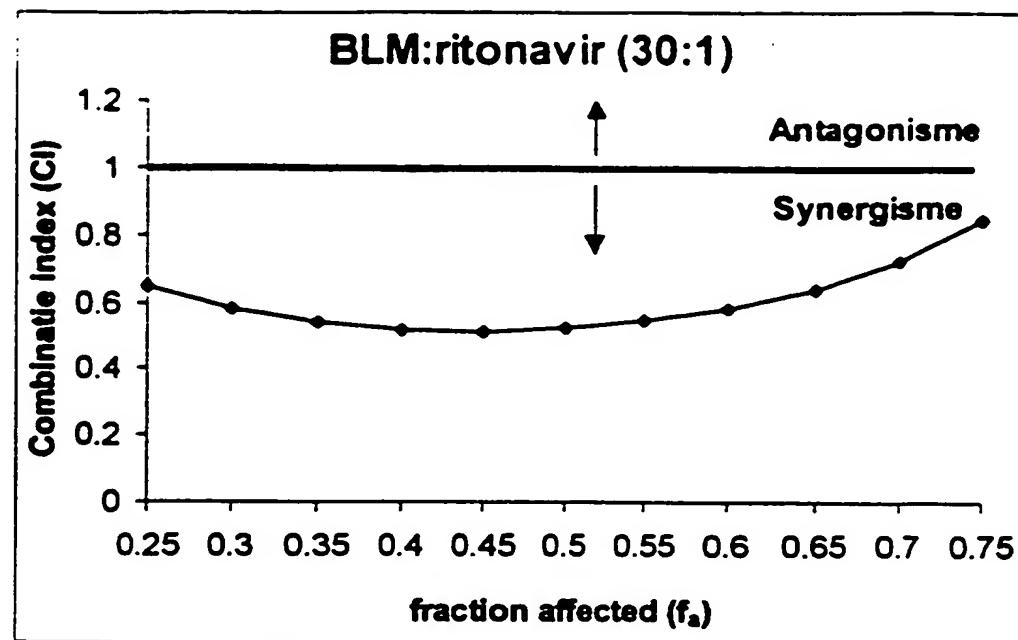


FIG. 6

SAMENWERKINGSVERBOND N.V.
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE		Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde NL 44084-Kp/hc						
Nederlandse aanvrage nr. 1012825		Indieningsdatum 13 augustus 1999						
		Ingeroepen voorrangsdatum						
Aanvrager (Naam) Faculteit Geneeskunde Universiteit Utrecht								
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal-type		Door de instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 33550 NL						
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)								
Volgens de Internationale classificatie (IPC) Int.Cl.7: A61K31/00 , A61K31/16 , A61K31/4412 , A61P39/04 , A61P31/18 , A61P35/00								
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="padding: 2px;">Onderzochte minimum documentatie</th> </tr> <tr> <th style="padding: 2px;">Classificatiesysteem</th> <th style="padding: 2px;">Classificatiesymbolen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Int.Cl.7:</td> <td style="padding: 2px;">A61K</td> </tr> </tbody> </table>			Onderzochte minimum documentatie		Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen	Int.Cl.7:	A61K
Onderzochte minimum documentatie								
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen							
Int.Cl.7:	A61K							
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen								
III. <input type="checkbox"/> GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)								
IV. <input type="checkbox"/> GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)								

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012825

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 7 A61K31/00 A61K31/16 A61K31/4412 A61P39/04 A61P31/18
//A61P35/00, (A61K31/00,
31:427, 31:7068)

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
IPC 7 A61K

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	<p>ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C</p> <p>---</p> <p>US 5 905 068 A (CHEN ET AL.) 18 Mei 1999 (1999-05-18) kolom 61, regel 16 - regel 31 kolom 62, regel 32</p> <p>---</p> <p>WO 97 21683 A (ABBOTT LABORATORIES) 19 Juni 1997 (1997-06-19) bladzijde 138 bladzijde 142, alinea 2 conclusies 32-35</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-7
X		1-7

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

* Speciale categorieën van aangehaalde documenten

- *A* document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang
- *E* eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna
- *L* document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publicatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven
- *O* document dat betrekking heeft op een mondelijke uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel
- *P* document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingevoerden datum van voorrang

T later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verdubbeling van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

X document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

Y document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

& document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

7 Juni 2000

Naam en adres van de instantie.

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

GAC, G

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012825

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	<p>DATABASE WPI Week 199908 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1999-094401 XP002139698 samenvatting & US 5 843 915 A (RES. INST. GENETIC & HUMAN THERAPY) 12 Januari 1998 (1998-01-12) & US 5 977 086 A (LISZIEWICZ ET AL.) 2 November 1999 (1999-11-02) samenvatting voorbeeld 2 kolom 5, regel 41 - regel 54 kolom 6, regel 10 - regel 16,65 ---</p>	1-4,6,7
E	<p>WO 92 15329 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 17 September 1992 (1992-09-17) bladzijde 5 conclusies 1,2,7,9,11,18 ---</p>	1-4,6,7
X	<p>WO 95 17899 A (COMPANY DE DEVELOPPEMENT AGUETTANT) 6 Juli 1995 (1995-07-06) bladzijde 4 -bladzijde 5 bladzijde 13, regel 21 - regel 28 conclusies ---</p>	1-3,6,7
X	<p>GAO ET AL.: "Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of hydroxyurea in combination with 2',3'-dideoxynucleosides" MOL. PHARMACOL., deel 46, nr. 4, 1994, bladzijden 767-772, XP000573476 het gehele document ---</p>	1-3,6,7
X	<p>MAYHEW ET AL.: "Effective use of ribonucleotide reductase inhibitors (didox and trimidox) alone or in combination with didanosine (ddI) to suppress disease progression and increase survival in murine acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS)" CELL. MOL. BIOL., deel 43, nr. 7, 1997, bladzijden 1019-1029, XP000913821 het gehele document ---</p>	1-3,6,7
		-/-

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012825

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 92 16200 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 1 Oktober 1992 (1992-10-01) bladzijde 2, regel 15 - regel 35 bladzijde 3, regel 1 - regel 24 bladzijde 4 bladzijde 5, regel 20 - regel 24 bladzijde 8, regel 2 - regel 6 bladzijde 9, regel 7 - regel 12 conclusies 1,7-9,16,17 ---	1-3
X	MALLEY S D ET AL: "SYNERGISTIC ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 EFFECT OF HYDROXAMATE COMPOUNDS WITH 2',3'-DIDEOXYINOSINE IN INFECTED RESTING HUMAN LYMPHOCYTES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, deel 91, 1 November 1994 (1994-11-01), bladzijden 11017-11021, XP000572692 ISSN: 0027-8424 het gehele document ---	1-3,6,7
X	SAPPEY ET AL: "Iron chelation decreases NF- κ B and HIV type 1 activation due to oxidative stress" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES,US,MARY ANN LIEBERT, deel 11, nr. 9, 1995, bladzijden 1049-1061, XP002104523 ISSN: 0889-2229 samenvatting bladzijde 1049, linker kolom bladzijde 1055, rechter kolom, laatste alinea bladzijde 1056; figuren 7B;7G bladzijde 1058, linker kolom bladzijde 1059, linker kolom, alinea 1 ---	1,2
Y	EP 0 484 071 A (MERCK & CO) 6 Mei 1992 (1992-05-06) bladzijde 3, regel 10 - regel 12 bladzijde 6, regel 36 - regel 42 ---	6,7
X	WO 95 27485 A (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY) 19 Oktober 1995 (1995-10-19) bladzijde 1, regel 27 - regel 31 ---	1-3
Y	bladzijde 3, regel 23 - regel 28 bladzijde 4 laatste twee verbindingen bladzijde 5 regelen 1-3,17 bladzijde 11, regel 1 - regel 5 bladzijde 12, regel 35 - regel 38 bladzijde 14; voorbeeld III conclusie 5 ---	6,7

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012825

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie	Geleerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	FEORINO P M ET AL: "PREVENTION OF ACTIVATION OF HIV-1 BY ANTIVIRAL AGENTS IN OM-10.1 CELLS" ANTIVIRAL CHEMISTRY & CHEMOTHERAPY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBL., LONDON, deel 4, nr. 1, 1 Januari 1993 (1993-01-01), bladzijden 55-63, XP000576587 ISSN: 0956-3202 bladzijde 58, rechter kolom, alinea 2; tabel 3 bladzijde 60, linker kolom, alinea 3 ---	1,2
Y	WO 94 26717 A (MERCK & CO) 24 November 1994 (1994-11-24) samenvatting bladzijde 62 ---	6,7
X	R M BURGER ET AL: "Mechanism of bleomycin action: in vitro studies" LIFE SCIENCES, GB, PERGAMON PRESS, OXFORD, deel 28, nr. 7, 1 Januari 1981 (1981-01-01), bladzijden 715-727, XP002095487 ISSN: 0024-3205 het gehele document ---	1,2
E	WO 99 59601 A (FACULTEIT GENEESKUNDIGE UNIVERSITEIT UTRECHT) 25 November 1999 (1999-11-25) het gehele document -----	1-3

ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C

Octroolaanvraag Nr.:
SN 33550
NL 1012825

Dit verslag van het onderzoek heeft geen betrekking op bepaalde conclusies omdat deze betrekking hebben op delen van de nationale aanvraag die niet voldoen aan de voorgeschreven vereisten, en wel in die mate dat geen zinvol nieuwheidsonderzoek verricht kan worden, in het bijzonder:

Niet volledig onderzochte conclusie(s):
1-7

Reden voor de beperking van het onderzoek:

De huidige conclusies 1,3-7 hebben betrekking op een farmaceuticum dat verbindingen bevat, die door middel van een verwijzing naar een verlangde karakteristiek of eigenschap, namelijk "een ijzerchelator", een "ander virusremmend middel", een "protease remmer", een "nucleinzuur-bindende chemotherapeutica" of een "reverse transcriptase remmer" zijn gedefinieerd.

De conclusies omvatten alle farmaceutica die verbindingen bevatten welke deze karakteristiek of eigenschap hebben, terwijl de aanvraag ondersteuning in de zin van Artikel 6 PCT en openbaring in de zin van Artikel 5 PCT verschaft voor slechts een zeer beperkt aantal van zulke farmaceutica.

In het onderhavige geval ontbreekt het de conclusies zodanig aan ondersteuning en de aanvraag zodanig aan openbaring, dat een zinvol nieuwheidsonderzoek over de gehele reikwijdte van de conclusies onmogelijk is. Onafhankelijk van bovenstaande redenering ontbreekt het de conclusies aan duidelijkheid (Artikel 6 PCT). Een poging is gedaan het farmaceuticum te definiëren door middel van een verwijzing naar een te behalen resultaat. Wederom, dit gebrek aan duidelijkheid is in het onderhavige geval zodanig dat een zinvol nieuwheidsonderzoek over de gehele reikwijdte van de conclusies onmogelijk is.

De huidige conclusie 2 heeft betrekking op een extreem groot aantal van mogelijke verbindingen ("hydroxamaten" en "hydroxypyridinonen"). In feite bevat de conclusie zoveel opties dat een gebrek aan duidelijkheid (en/of beknoptheid) in de zin van Artikel 6 PCT in die mate ontstaat dat een zinvol nieuwheidsonderzoek van de conclusie onmogelijk is.

Bijgevolg is het nieuwheidsonderzoek voor die delen van de conclusies uitgevoerd welke duidelijk, ondersteund en geopenbaard schijnen te zijn, namelijk die delen die betrekking hebben op farmaceutica, die deferoxamine, deferiprone of bleomycine bevatten, met of zonder ritonavir of dideoxyinosine.

Aanvraagster's aandacht wordt gevestigd op het feit dat conclusies, of delen van conclusies, die betrekking hebben op uitvindingen waarvoor geen internationaal nieuwheidsonderzoeks rapport tot stand is gebracht, niet aan een internationale voorlopige verlenings procedure ('international preliminary examination') behoeven te worden onderworpen (Regel 66.1(e) PCT). Aanvraagster wordt gemeld dat het beleid van het EOB is om, wanneer zij optreedt als IPEA, gewoonlijk geen voorlopige verlenings procedure uit te voeren voor materie die niet is onderzocht. Dit is het geval, onafhankelijk van het feit of de conclusies wel of niet zijn gemaandeed na ontvangst van het internationaal nieuwheidsonderzoeks rapport of gedurende enige 'Chapter II' procedure.

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN

INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012825

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)			Datum van publicatie
US 5905068	A	18-05-1999			GEEN
WO 9721683	A	19-06-1997	AU	1342297 A	03-07-1997
			CA	2238977 A	19-06-1997
			CA	2238978 A	19-06-1997
			CN	1208405 A	17-02-1999
			CZ	9801762 A	11-11-1998
			EP	0876353 A	11-11-1998
			EP	0882024 A	09-12-1998
			HU	9901079 A	28-09-1999
			WO	9721685 A	19-06-1997
			US	5914332 A	22-06-1999

R., Markowitz, N., Sampson, J. H., Thompson, M., Deyton, L. & Beirn, T. (1994) *N. Engl. J. Med.* **330**, 657-662.

13. Concorde Coordinating Committee: Seligmann, M., Warrell, D. A., Aboulker, J.-P., Carbon, C., Derbyshire, J. H., *et al.* (1994) *Lancet* **343**, 871-881.

14. Zack, J. A., Cann, A. J., Lugo, J. P. & Chen, I. S. Y. (1988) *Science* **240**, 1026-1029.

15. Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. & Chen, I. S. Y. (1990) *Cell* **61**, 213-222.

16. Stevenson, M., Stannick, T. L., Dempsey, M. P. & Lamontica, C. A. (1990) *EMBO J.* **9**, 1551-1560.

17. Zack, J. A., Haislip, A. M., Krogstad, P. & Chen, I. S. Y. (1992) *J. Virol.* **66**, 1717-1725.

18. Bukrinsky, M. I., Stannick, T. L., Dempsey, M. P. & Stevenson, M. (1991) *Science* **254**, 423-427.

19. Gao, W.-Y., Cara, A., Gallo, R. & Lori, F. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8925-8928.

20. Tournaire, R., Malley, S., Hamed-Sangsari, F., Thomasset, N., Grange, J., Doré, J.-F. & Vila, J. R. (1994) *Int. J. Cancer* **58**, 420-425.

21. Yarbro, J. W. (1992) *Semin. Oncol.* **19**, Suppl. 9, 1-10.

22. Mitsuya, H., Jarrett, R. F., Matsukura, M., di Marzo Veronese, F., Devico, A. L., Sarngadharan, M. G., Johns, D. G., Reitz, M. S. & Broder, S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2033-2037.

23. Huang, P., Farquhar, D. & Plunkett, W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11914-11918.

24. Yarbro, J. W. (1968) *Cancer Res.* **28**, 1082-1087.

25. Donehower, R. C. (1992) *Semin. Oncol.* **19**, Suppl. 9, 11-19.

26. Thomasset, N., Hamed-Sangsari, F., Tournaire, R., Navarro, C., Malley, S., Goetsch, L., Grange, J. & Vila, J. R. (1991) *Int. J. Cancer* **49**, 421-424.

27. Vila, J. R., Thomasset, N., Navarro, C. & Doré, J.-F. (1990) *Int. J. Cancer* **45**, 737-743.

28. Yarchoan, R., Mitsuya, H., Myers, C. E. & Broder, S. (1989) *N. Engl. J. Med.* **321**, 726-738.

29. Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J. & De Clercq, E. (1988) *J. Virol. Methods* **20**, 309-321.

30. Törnevik, Y., Jacobson, B., Britton, S. & Eriksson, S. (1991) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**, 751-759.

31. Yarchoan, R., Perno, C. F., Thomas, R. V., Klecker, R. W., Allain, J.-P., Wills, R. J., McAtee, N., Fischl, M. A., Dubinsky, R., McNeely, M. C., Mitsuya, H., Pluda, J. M., Lawley, T. J., Leuther, M., Safai, B., Collins, J. M., Myers, C. E. & Broder, S. (1988) *Lancet* **1**, 76-81.

32. Merigan, T. C., Skowron, G., Bozette, S. A., Richman, D., Uttamchandani, R., Fischl, M., Schooley, R., Hirsch, M., Soo, W., Pettinelli, C., Schaumburg, H. & the ddC Study Group of the AIDS Clinical Trials Group (1989) *Ann. Intern. Med.* **110**, 189-194.

33. Elford, H. L., Freese, M., Passamani, E. & Morris, H. P. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 5228-5233.

34. Engström, Y., Ericksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L. & Tribukait, B. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 9114-9116.

35. Ericksson, S. & Martin, D. W., Jr. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9436-9440.

36. Reichard, P. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 349-374.

37. Holmes, M. A. & Matthews, B. W. (1981) *Biochemistry* **20**, 6912-6920.

38. Baker, J. O., Wilkes, S. H., Bayliss, M. E. & Prescott, J. M. (1983) *Biochemistry* **22**, 2098-2103.

39. Davies, J. F., Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S. R. & Matthews, D. A. (1991) *Science* **252**, 88-95.

40. Berg, J. M. (1986) *Science* **232**, 485-487.

41. Chance, M. R., Sagi, I., Wirt, M. D., Frisbie, S. M., Scheuring, E., Chen, E., Bess, J. W., Jr., Henderson, L. E., Arthur, L. O., South, T. L., Perez-Alvarado, G. & Summers, M. F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10124-10128.

42. Summers, M. F., Henderson, L. E., Chance, M. R., Bess, J. W., Jr., South, T. L., Blake, P. R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R. C., Hare, D. R. & Arthur, L. O. (1992) *Protein Sci.* **1**, 563-574.

43. Harel, J., Rassart, E. & Jolicoeur, P. (1981) *Virology* **110**, 202-207.

44. Varmus, H. E., Padgett, T., Deasley, S., Simon, G. & Bishop, J. M. (1977) *Cell* **11**, 307-319.

45. Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K. & Haase, A. T. (1993) *Nature (London)* **362**, 359-362.

46. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Monti, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P. & Fauci, A. S. (1993) *Nature (London)* **362**, 355-358.

47. Reed, L. J. & Muench, H. (1938) *Am. J. Hyg.* **27**, 493-497.